أمثَلة نمو ثلاثة أنواع من الفطر .Aspergillus sp على أوساط محضّرة من المخلفات الزراعية وتقييم تغيراتها المورفولوجية وإنتاجها للبروتين وحيد الخلية

نادِيا خضر [1] ، أ. د. عدنان علي نظام [2]

[1] طالبة دكتوراه، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية
[2] أستاذ دكتور، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية

الملخص

تُعدّ إدارة المخلفات مشكلة رئيسة تواجهها بلدان العالم كافة، وقد نالت اهتماماً متزايداً فيما يتعلق بتحويل المخلفات الزراعية إلى أشكال مفيدة بيئياً وصناعياً، في هذا البحث استُعملت مخلفات بعض المحاصيل الزراعية في تركيب أوساط ذات خصائص تنموية وتصنيفية للفطريات، لتنمية 3 أنواع من الفطر .Aspergillus sp ذي المقدرة الاستقلابية والصناعية وهي Aspergillus niger ،Aspergillus flavus ،Aspergillus avenaceus، وطُبِّقت أمثلة شروط نموه ضمنها، كالقوام ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني. أظهرت نتائج البحث مقدرة الأنواع على النمو ضمن أوساط تقوم على أساس المخلفات الزراعية وتميزها بصفات مورفولوجية نوعية وتفضيلها عموماً للوسط الحاوي على الألياف وفي درجة حرارة حضن 28 ^{o}م وتفضيلها لمجال الرقم الهيدروجيني 5–5.6، وتبين تفوّق وسط المخلفات الزراعية على الوسط التجاري في تحفيز إنتاج كتلة حيوية فطرية عالية إذ إن Aspergillus avenaceus أعطى أعلى قيمة لوزن الأفطورة عن باقي الأنواع حيث وصلت 1.14 ± 0.09غ، وأظهرت جميع النتائج فروقاً ذات دلالة إحصائية (0.05) بين الأنواع المزروعة على وسط المخلفات الزراعية مقارنة بالوسط التجاري كعنصر شاهد.

الكلمات المفتاحية: المخلفات الزراعية، الأمثلة، الفطريات، Aspergillus، إنتاج البروتينات.

تاريخ الإيداع: 2022/04/14
تاريخ الموافقة: 2022/08/03

حقوق النشر: جامعة دمشق –سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

Optimization of Aspergillus sp. growth on prepared agricultural wastes media and evaluation of its morphological changes and production of single cell protein

Nadia Khodor[1] ، Prof. Adnan Ali – Nizam[2]

[1] Ph.D. Students, . at Department of Plant Biology,Faculty of Science, University of Damascus, Syrian Arab Republic

[2]Prof. at Department of Plant Biology, Faculty of Science, University of Damascus, Syrian Arab Republic

Received :2022/04/14
Accepted:2022/08/03

Copyright:Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract:

Waste management is a major problem faced by all countries of the world, and it has received increasing attention with regard to converting agricultural waste into environmentally and industrially useful forms. In this research waste of some agricultural crops was used to the composition of fungal growth media with developmental and taxonomic characteristics, it was used to grow Aspergillus species with metabolic and industrial capacity ability: Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus avenaceus, and optimization of its growth conditions were applied, such as texture, temperature, and pH. The results of the research showed the ability of the species to grow in media based on agricultural waste, its qualitative morphological characteristics, its preference in general for the medium containing fibers and at an incubation temperature of 28 ºC, and its preference for the pH range 5-5.6. The superiority of the medium of agricultural residues over the commercial medium in stimulating the production of high fungal biomass was shown, as Aspergillus avenaceus gave the highest value for the mycelium weight than the rest of the species as it reached (1.14 ± 0.09 g). All results showed statistically significant differences (0.05) between the species grown on the medium of agricultural residues compared to the commercial medium as a control

Keywords: Agricultural Waste, Optimization, Fungi, Aspergillus Sp., Protein Production.

1. المقدمة:

تستأثر المخلفات الزراعية والعضوية بأهمية اقتصادية وصناعية، حتى أصبح اهتمام الدول لا يتوقف عند تحقيق أعلى إنتاج زراعي بل يمتدّ إلى الاهتمام بالاستفادة من مخلفاتها وتحويلها إلى قيمة اقتصادية للمزارعين والبيئة، يسبب التخلص من المخلفات العضوية في مكب النفايات أو الحرق إلى حدوث أضرار شديدة ومشكلات بيئية من خلال انبعاثات غازات الدفيئة المباشرة وغير المباشرة (الميتان وثنائي أكسيد الكربون)، كما يسبب تحويل هذه المخلفات إلى سماد زيادة احتمالية تلوث المياه السطحية والجوفية إضافة إلى ارتفاع كلفة التحويل. يتميز استعمال المخلفات العضوية في إنتاج الوقود والمواد الكيميائية بتأثير إيجابي على الطاقة واستدامة البيئة والتنمية الاقتصادية (Huang et al., 2015, 2). تتصف المخلفات الزراعية العضوية بمحتواها الغني بالكربون والنتروجين؛ مما يجعلها مناسبة لتنمية الأحياء الدقيقة ذات الميزات الخاصة ويسمح باستثمارها وتحويلها إلى مواد مهمة اقتصادياً (Singh et al., 2019, 3).

وفي هذا المجال استُعمل فطر .Aspergillus sp الذي ينتمي إلى شعبة الفطريات الزقية Ascomycota في التخلص من المخلفات الزراعية الصلبة والسائلة كالفينولات الناتجة عن معاصر الزيتون (Garcıa et al., 2000, 754-755)، وتحويل مياه صرف عصر الزيتون إلى سماد طبيعي (Cereti et al., 2004, 137-138) والنمو ضمن مخلفات صناعة السكر وإنتاج كتلة حيوية غنية بالكربوهيدرات والبروتين والدهون (Chuppa-Tostain et al., 2018, 7)، وأُجريت تنمية الفطر على مخلفات قشر الموز وأعطى كتلة خيوط فطرية عالية (Yabaya and Ado, 2008, 4)، وكذلك تنمية فطر .Aspergillus sp على المخلفات السائلة الناتجة عن تصنيع حمض الغلوتاميك واستعمل البروتين المنتج في تغذية أفراخ الدجاج (Chiou et al., 2001, 177).

واستعمل في التخلص من المخلفات الزراعية عن طريق تنميته عليها وبالتالي الحصول على نواتج مهمة اقتصادياً (Christabel et al., 2016, 140)، حيث يتميز العديد من أنواع Aspergillus بمقدرات استقلابية عالية وبإفرازها أكثر من 800 مُستَقلب ثانوي (Sáez-Plaza et al., 2013, 1-2, Vadlapudi et al., 2017, 2)، أهمها الإنزيمات الصناعية مثل: Amylase، Glucoamylase، Protease، Pectinase، Lipase وغيرها؛ والعديد من الحموض العضوية مثل: Citric acid، Fumaric acid، Gluconic acid، Itaconic acid، وتعد أنواع جنس Aspergillus مصدراً لإنتاج البروتينات مثل البروتين وحيد الخلية المستعمل في إغناء غذاء الإنسان وأعلاف الحيوانات بمجموعة واسعة من الحموض الأمينية المهمة وإنتاج الفينولات الفطرية المتنوعة التي يمكن استعمالها كمضادات تأكسد مضافة إلى الأغذية، وكذلك في صناعة المواد المطهرة وصناعة بعض المواد البلاستيكية (Smith 2012, 177-227, Hamdy 2013, 7930).

تستعمل لتنمية الفطريات ولاسيما فطر .Aspergillus sp مجموعة واسعة من أوساط التنمية ويفضل العلماء استعمال أنواع محددة حسب نوع التجربة والفطر المراد تنميته، فتركيب الوسط يؤثر مباشرة في شكل المستعمرة ولونها وتشكيل تراكيبها المختلفة، ويُختار الوسط تبعاً لمقدرة الفطر على إفراز الإنزيمات القادرة على التحليل والاستفادة من مركباته، كما أظهرت الأبحاث تأثير العوامل الفيزيائية والكيميائية في الخصائص التشخيصية للفطريات، وبينت أهمية استعمال مجموعة متنوعة من الأوساط تصنيفياً لوجود اختلافات مورفولوجية وفيزيولوجية كبيرة لاسيما ضمن الفطريات الخيطية (Sharma et al., 2010, 157).

عموماً، تحتوي الأوساط الفطرية مصادر عالية من السكريات والنتروجين إضافة إلى رقم هيدروجيني يتراوح بين 5–6، وتقسم إلى أوساط طبيعية وصنعية، تتألف الأوساط الطبيعية من ركائز طبيعية مثل السوق العشبية أو الخشبية، البذور والأوراق وتكون هذه الأوساط سهلة التركيب ولكن تفتقر لمعرفة تركيبها الدقيق، أما الأوساط الصنعية فتتميز بتركيب معروف ومحدد واحتوائها على كميات محددة من السكريات والنتروجين ومصادر الفيتامينات، بالمجمل تكون الأوساط التجارية المستعملة في المختبرات ذات كلفة عالية؛ لذلك كان البحث عن مصادر رخيصة ومتوفرة لعنصر الكربون للتنمية الفطرية (Basu et al., 2015, 184).

كما استُعمل في بحث آخر مخلفات بعض المحاصيل الزراعية (البطاطا الحلوة والبطاطا والجزر) في صناعة أوساط فطرية وكان لها مقدرة كبيرة في تنمية مجموعة من الفطريات من ضمنها فطر .Aspergillus sp (Christabel et al., 2016, 139).

2. الأهمية والأهداف

نظراً إلى غنى المخلفات الزراعية بمصادر الكربون وهدر كميات كبيرةٍ منها، وارتفاع كلفة الأوساط الصنعية لتنمية الفطريات، ومقدرة أنواع Aspergillus على النمو على مختلف مواد المخلفات الزراعية والأغذية وإنتاج العديد من المركبات المهمة في الوقت نفسه، وانتشاره الواسع في البيئة ودوره المميز في التدوير، فإن البحث يهدف إلى:

(1) تركيب وتقييم وسط جديد من مواد المخلفات الزراعية.

(2) أمثلة شروط نمو أنواع فطر Aspergillus المعزولة محلياً على الوسط الطبيعي المحضر وهي Aspergillus niger، Aspergillus flavus، Aspergillus avenaceus.

(3) مقارنة التغيرات المورفولوجية للأنواع المنمّاة على وسطي خلاصة الشعير ومواد المخلفات الزراعية.

(4) تحديد كفاءة إنتاج الأنواع للبروتين على الوسط الطبيعي المحضر.

3. مواد البحث وطرائقه

1.3 تجميع مواد المخلفات الزراعية

جمعت بقايا المخلفات الزراعية من سوق الهال بدمشق خلال العام 2021، وكانت مختلفة القوام والتركيب، كالآتي: درنات البطاطا، ثمار الباذنجان، ثمار الكوسا، قشور ثمار البرتقال، بقايا عرانيس الذرة، بقايا قرون الفول، أوراق الفول، سوق الفول.

بعد تنظيف المخلفات وتعريضها للتجفيف بالهواء بعيداً عن أشعة الشمس، قُطِّعت إلى أجزاء صغيرة، وجفّفت حتى ثبات الوزن، ثم طحنت العينات لتحويلها إلى مساحيق باستعمال خلاط كهربائي، ووضعت ضمن أكياس بلاستيكية نظيفة وجافة، وحفظت في درجة حرارة الغرفة في مكان جاف لحين الاستعمال (Saheed et al., 2016, 2).

2.3 تقدير التركيب الكيميائي لمركّبات المخلفات الزراعية

استُخلصت السكريات والبروتينات بطريقة التعقيم بالحرارة الرطبة باستعمال الماء كمذيب لتطبيق الشروط نفسها التي يتعرض لها الوسط عند زرع الأنواع الفطرية عليه، وأخذ 0.04 غ من مسحوق المخلفات ووضعت ضمن 10 مل من الماء المقطر، وعُقِّمت الأنابيب في الأوتوغلاف بدرجة الحرارة 121 مئوية مدة 20 دقيقة (Passos et al., 2006, 1734).

تحديد نسبة السكريات بطريقة حمض الكبريت والفينول

أُخذ 15 ميكرولتراً من المحلول الطافي لكل عينة وتممت بالماء المقطر حتى حجم 500 ميكرولتر وأضيف إليها 500 ميكروليتر من الفينول 18% وحضنت بدرجة حرارة الغرفة مدة ساعة، وأضيف 2.5 مل من حمض الكبريت المركز. قُرأت امتصاصية العينات على المطيافية الضوئية بطول موجة 490 نانومتراً، وحُدّد المحتوى الكلي للسكريات بإسقاط قيم الامتصاصية الناتجة على المنحني المعياري لمحلول الغلوكوز (Dubois et al., 1956, 350).

تحديد نسبة البروتينات بطريقة برادفورد

أُخذ 25 ميكرولتراً من المحلول الطافي لكل عينة، وتمم حجمها إلى 1 مل بالماء المقطر وأضيف إليها 1 مل من كاشف أزرق الكوماسي (50 مل إتانول 96% + 100 مل حمض الفُسفور 85% + 100 ملغ صبغة الكوماسي G وتمم الحجم إلى 1 لتر من الماء المقطر). مُزجت جيداً ثم قرأت امتصاصية العينات على المطيافية الضوئية بطول موجة 595 نانومتراً، وحُدّد المحتوى الكلي للبروتينات من خلال إسقاط قيم الامتصاصية الناتجة على المنحني المعياري لمحلول الكازيين في محلول كلور الصوديوم (Bradford 1976, 249-250).

تحديد نسبة الألياف

سُخن 1 غ من عينات مسحوق المخلفات المجفف مع 35 مل مزيج إتانول حمض النتروجين (1:3) في دورق مجهز بمبرد مرتد مدة ساعة، ثم إبانة السائل الطافي على قمع بوخنر مجفف وموزون بدقة. عولج الراسب بالمزيج نفسه مع الغلي مدة ساعة على

حمام مائي، وأُعيد العمل 4 مرات. رشّح المزيج وغسل الراسب بالماء المقطر الساخن حتى التعادل، ثم بكمية قليلة من الإتانول، جفف الراسب حتى ثبات الوزن، حسبت نسبة الألياف من فرق الوزن (البحرة 2003، 48).

تحديد نسبة الكربون للمخلفات الزراعية

تحديد نسبة عنصر الكربون بطريقة الفقد من خلال أكسدة المادة الزراعية بحرقها: وُضع 5 غ من المسحوق النباتي الجاف تماماً في جفنة بورسلين جافة ثم وزنت معاً. وضعت جفنة البورسلين مع المسحوق في الفرن بعد ضبطه على درجة حرارة 450 م مدة 5 ساعات ثم على درجة 600 م مدة 6 ساعات. ثم وضعت في المجفف حتى تبرد ووزنت مع محتواها من المسحوق المحروق، وحسبت نسبة المادة العضوية Organic matter بالمعادلة الآتية:

OM% = وزن المسحوق النباتي الجاف تماماً – وزنه بعد الحرق*100/وزن المسحوق النباتي الجاف تماماً

وحُسبت نسبة عنصر الكربون بالمعادلة الآتية:

نسبة المادة العضوية/ 1.724 (Fernandes et al., 2015, 498).

تحديد نسبة عنصر النتروجين بطريقة كلدال

مرحلة الهضم: وزن 0.5 غ من المسحوق النباتي ووضعت ضمن دورق الهضم، وأُضيف 10 غ من مخلوط الهضم المؤكسد و11 مل من حمض الكبريت المركز. أجري التسخين ببطء في البداية حتى توقف الفوران ثم أجري الغليان حتى تمام الهضم، ويستدل عليه بتحول المحلول إلى عديم اللون أو أزرق مخضر، وبعد تمام الهضم أوقف التسخين وبرد المحلول. ثم أضيف نحو 100 مل ماء مقطر إلى الدورق.

مرحلة التقطير: وضع في دورق الاستقبال 30 مل من حمض البوريك 3% ثم أضيف إليه قطرة من مشعر أحمر المتيل وقطرتين من مشعر أزرق المتيل أعطى لوناً بنفسجياً ثم وضع الدورق في أنبوبة الاستقبال. وضع في دورق التقطير 50 مل من العينة وأضيف إليها 100 مل ماء مقطر ثم 50 مل ماءات الصوديوم ووضع الدورق في مكانه وشغل الجهاز على المستوي الثالث للحرارة مع تشغيل الماء والانتظار حتى يتحول لون دورق الاستقبال إلى اللون الأخضر وإكمال الحجم إلى 100 مل. أُجريت معايرة العينة بعد إتمام حجمها إلى 100 مل بحمض كلور الماء حتى إرجاع اللون إلى البنفسجي. حُسبت نسبة عنصر النتروجين وفق المعادلة الآتية:

حجم حمض كلور الماء القياسي اللازم للمعايرة (مل) * عيارية الحمض (0.1) * مكافئ عنصر النتروجين (1.4) / وزن العينة (غ) (Barthet and Daun, 2011, 151).

3.3 تحضير وسط المخلفات الزراعية وتنمية أنواع Aspergillus

حُضَر وسط المخلفات الزراعية 1 Agricultural Wastes 1 (W1) بإضافة 1 غ من كل مسحوق نباتي و 3.5 غ من الآغار إلى كل 250 مل من الماء المقطر وقيس pH الوسط، ثم أجريت عملية التعقيم بالأوتوكلاف، ووزع الوسط في أطباق بتري ثم لقح عليها بطريقة الوخز بالأنواع المدروسة المعزولة من عينات ترب حراجية (Aspergillus niger من منطقة البهلولية، Aspergillus flavus من محافظة السويداء،Aspergillus avenaceus من منطقة قابيل) وحضنت مدة 7 أيام بدرجة حرارة 25°م (Christabel et al., 2016, 138).

أمثلة قوام وتركيب وسط المخلفات الزراعية

حُضر وسط المخلفات الزراعية 2 Agricultural Wastes 2 (W2) كما في حالة W1، ثم أجريت عليه عملية تصفية لاستبعاد الألياف والشوائب باستعمال قطع من الشاش المعقم ثم ضُبط pH 5.6 فإعادة التعقيم بالأوتوغلاف.

حضّر وسط المخلفات الزراعية 3 Agricultural Wastes 3 (W3) كما في حالة W2، ثم أضيفت خلاصة الخميرة 2% و125 مل من مستخلص التربة المحضّر من تربة حديقة كلية العلوم بجامعة دمشق، إلى كل 250 مل من الوسط وضُبط pH 5.6 ثم عقم بالأوتوغلاف، لقحت أطباق الأوساط المختلفة بالأنواع وحضنت في درجة حرارة 25 م°.

أمثلة الرقم الهيدروجيني pH لوسط المخلفات الزراعية

حُضّر وسط المخلفات الزراعية W1 وضبط الرقم الهيدروجيني بجهاز pH-meter قبل التعقيم وفق سلسلة متدرجة كالآتي: 3، 3.5، 4.0، 4.5، 5.0، 5.6، حيث اختُير pH 5.6 في نهاية السلسلة لمقارنتها بالوسط التجاري خلاصة الشعير الآغاري Malt extract agar (MEA)، ولُقّحت الأطباق وحُضنت في الدرجة 25 م° مدة 7 أيام، وقُيس قطر المستعمرة النامية ولوحظ نموها وشدة تبوغها (Abubakar et al., 2013, 65).

أمثلة درجة حرارة حضن الفطر على وسط المخلفات الزراعية

ضُبط الرقم الهيدروجيني للوسط على pH 5.6، لُقّحت الأطباق بالأنواع المدروسة وحُضن كل مكرر منها مدة 7 أيام في درجة حرارة ضمن سلسلة كالآتي: 20، 25، 28، 30، 37 م°، وقيس قطر المستعمرة النامية ولوحظت شدة التبوغ (Pang et al.,2020, 3).

4.3 تقييم التغيرات المورفولوجية للأنواع المدروسة على وسط المخلفات الزراعية

أُجري تقييم التغيرات المورفولوجية الناتجة على الأنواع مثل لون المستعمرة وشكلها وأبعاد قطرها بعد زرعها على الوسط المركّب المختار للأمثلة، وقيست مقدرتها على تفكيك المخلفات الزراعية المستعملة اعتماداً على شدة النمو والتبوغ ومقارنتها بالأنواع النامية نفسها على وسط MEA (Diba et al., 2007, 869).

5.3 تنمية الأنواع على وسط المخلفات الزراعية السائل حسب طرق الأمثلة

حُضِّر وسط المخلفات الزراعية السائل W2 وضبط الرقم الهيدروجيني pH حسب نتائج الأمثلة السابقة وأعيد تعقيمه، ثم لُقّح الوسط W2 ووسط MEA بلقاح بوغي تركيزه مليون بوغة/مل لحجم 175 مل من الوسط وحضنت مدة 10 أيام في درجة حرارة 28 م°، رشحت الأفطورات بعد النمو وفصلت عن الوسط، جُففت حتى ثبات الوزن ضمن فرن هوائي وحسب المردود الوزني لها، سحقت ووضعت ضمن عبوات جافة (Lafi 2010, 31).

6.3 تحديد نسبة البروتين في الأنواع النامية على وسط المخلفات الزراعية ووسط خلاصة الشعير

حُضِّر لاستخلاص البروتين محلول اليوريا مع SDS وهو يحتوي على 1.5% SDS، 9 مول يوريا 25 مل مول Tris-HCL (pH 6.8) و10 مل مول EDTA و0.7 مول ß–mercaptoethanol، أُخذ 0.2 غ من كل مسحوق فطري وأضيف إليه 2 مل من محلول اليوريا ومزج جيداً، ثفلت العينات وأخذ 25 ميكرولتراً من الخلاصة وحسبت نسبة البروتين فيها حسب برادفورد (Krishnaswamy et al., 2019, 101).

7.3 الدراسة الإحصائية

أجري معظم التجارب بعمل ثلاثة مكررات للتجربة الواحدة على الأقل، واستعمل برنامج SPSS 22 لمعالجة البيانات إحصائياً وتحليلها. اعتمد اختبار تحليل التباين ثنائي الاتجاه Two way analysis of variance (ANOVA) لدراسة الفروق المعنوية لكل من متوسط وزن الأفطورة وتركيز البروتين وأقطار المستعمرات للأنواع المنماة على وسط المخلفات الزراعية ضمن قيم pH مختلفة ودرجات حرارة مختلفة، ودراسة الفروق المعنوية لمتوسطات أقطار المستعمرات على وسط خلاصة الشعير الصلب ووسط مخلفات الزراعية، كما اعتمد اختبار تحليل التباين أحادي الاتجاه One way analysis of variance (ANOVA) لدراسة الفروق المعنوية لكل من متوسط تركيز السكريات والبروتين ووزن الألياف ونسبة عنصر الكربون والنتروجين للعينات النباتية، ولتحديد مصدر هذه الفروق تم إجراء تحليل LSD للمقارنات البعدية، كما عُدت القيمة $P<0.05$ كقيمة يعتد بها إحصائياً بمستوى ثقة 95%.

4. النتائج والمناقشة

1.4 تقدير التركيب الكيميائي لمواد المخلفات الزراعية

السكريات– أظهرت نتائج تقدير كمية السكريات في عينات المخلفات الزراعية المستخلصة بالماء وبحرارة الأوتوغلاف تفوّق مخلفات ثمار الباذنجان بالمحتوى السكري على باقي المخلفات، إذ بلغ متوسط نسبة السكريات فيها 853.02 ± 6.2 ملغ/غ وهذا يوافق نتائج أبحاث أخرى (Quamruzzaman et al., 2020, 4)، وبلغت أدنى قيمة لمخلفات أوراق الفول 287.07 ± 2 ملغ /غ،

كما تفوق متوسط كمية السكريات في وسط خلاصة الشعير على وسط المخلفات الزراعية، إذ بلغت الكمية 725.72 ± 4.8 ملغ /غ، 556.03 ± 2.2 ملغ/غ على التتالي (الجدول 1).

البروتينات– بينت نتائج تقدير كمية البروتينات تفوّق مخلّفات ثمار الكوسا بالمحتوى البروتيني على باقي المخلفات، إذ بلغ متوسط نسبتها 61.10 ± 4.5 ملغ/غ، وبلغت أدنى قيمة لمخلفات قشور ثمار البرتقال بمحتوى 8.15 ± 3 ملغ/غ، وتفوق متوسط كمية البروتينات في وسط خلاصة الشعير على وسط المخلفات الزراعية، إذ بلغت الكمية على التتالي 42.70 ± 4 ملغ /غ، 25.98 ± 4.1 ملغ/غ (الجدول1).

الألياف– أبدت نتائج تحليل كمية الألياف في المخلفات الزراعية تفوق نتائج قشور عرانيس الذرة بقيمة بلغت 0.128 ± 0.06 غ وتدني قيمة الألياف في مخلفات درنات البطاطا إذ بلغت 0.009 ± 0.001 غ (الجدول1)، كما أظهرت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات قيم تركيز السكريات والبروتين ووزن الألياف في العينات النباتية المختلفة بدالة إحصائية أقل من 0.05 وحسبت قيمة أقل فرق معنوي LSD بين قيم المتوسطات لكل متغير من المتغيرات الثلاثة كما يوضحه (الجدول 1).

الجدول 1. تركيز السكريات والبروتين ووزن الألياف ضمن مواد المخلفات الزراعية، ملغ/غ.

العينات	تركيز السكريات	تركيز البروتين	وزن الألياف
قشور قرون الفول	5 ± 662.9	0.5 ± 28.3	8 ± 114
سوق الفول	3 ± 385.3	1.6 ± 14.1	5.5 ± 96
أوراق الفول	2 ± 287	2.3 ± 29.9	3 ± 34
قشور عرانيس الذرة	3.5 ± 484	1.7 ± 14.8	7 ± 128
ثمار الباذنجان	6.2 ± 853	3.3 ± 26.8	3.2 ± 33
درنات البطاطا	4.1 ± 625	3.6 ± 24.8	1.5 ± 9
ثمار الكوسا	4.6 ± 414.2	4.5 ± 61.1	3.6 ± 43
قشور ثمار البرتقال	3.6 ± 791.3	3 ± 8.1	2.8 ± 35
وسط المخلفات الزراعية	2.2 ± 556	4.1 ± 25.9	-
وسط خلاصة الشعير	4.8 ± 725.7	4 ± 42.7	-
Sig	0.000	0.000	0.000
LSD	13.65	10.65	16.67

2.4 تحديد نسبة الكربون نتروجين للمخلفات النباتية

ظهرت أعلى نسبة للكربون ضمن ثمار الكوسا بقيمة 61 ± 1.2% وأدنى نسبة ضمن أوراق الفول بقيمة 38.8 ± 1.8%، وبلغت أعلى نسبة لعنصر النتروجين ضمن الكوسا بقيمة 5.88 ± 1.1% وأدنى قيمة لقشور عرانيس الذرة بقيمة 0.896 ± 0.01%، وكانت أعلى قيمة لنسبة الكربون نتروجين لمخلفات قشور ثمار الذرة 63:1 وأخفض نسبة لأوراق الفول 12:1 (الجدول 2)، وبعد حساب نسبة الكربون نتروجين لخليط العينات الذي يحوي كميات متساوية من كل عينة كانت النسبة تقريباً 32:1 وهي نسبة مثالية لتنمية الفطريات وأعلى من النسبة الموجودة في وسط خلاصة الشعير 5:1 (Ajdari et al., 2011, 5; Said et al., 2019, 5)، أظهرت النتائج الإحصائية وجود فروق معنوية لمتوسطات قيم عنصر الكربون والنتروجين في العينات النباتية المختلفة بدالة إحصائية أقل من 0.05.

الجدول 2. نسبة عنصري الكربون والنتروجين في العينات النباتية.

العينات النباتية	عنصر الكربون	عنصر الآزوت	C:N
بقايا قرون الفول	1.4±55.3	0.4±2.016	27: 1
أوراق الفول	1.8±49.3	0.6±3.976	12: 1
سوق الفول	1.5±51.7	0.3±1.45	36:1
بقايا عرانيس الذرة	2.1±56.4	0.01±0.896	63:1
ثمار الباذنجان	0.8±54.4	0.5±2.07	26: 1
درنات البطاطا	0.7±55.4	0.6±2.18	26: 1
ثمار الكوسا	1.2±77.4	1.1±5.88	13: 1
قشور ثمار البرتقال	0.5±55.7	0.8±1.06	53: 1
Sig	0.000	0.000	–
LSD	4.69	2.15	–

3.4 تقييم تركيب وسط المخلفات الزراعية

أظهرت نتائج تنمية الفطر على الأوساط المختلفة إمكان استعمال هذه الأوساط لتنمية الفطريات واحتوائها العناصر الغذائية المطلوبة مع اختلاف في مقدرتها على النمو، إذ تفوّق وسط خلاصة الشعير في تنمية الفطر على أوساط المخلفات الزراعية بمقدار 1سم لقطر مستعمرة الأنواع المدروسة (الجدول 3)، ويمكن أن يعود ذلك لكون الوسط التجاري ذا تركيب كيميائي دقيق ومكوناته بسيطة وليست بحاجة لنشاط إنزيمي عال، خالفت نتائجنا نتائج دراسة على قشور مخلفات زراعية استعملت لتنمية مجموعة فطريات من ضمنها A. flavus، وأظهرت النتائج تفوّق وسط قشور الفواكه على باقي الأوساط التجارية ومن ضمنها وسط السابورد، ويمكن أن يعود ذلك لتدعيم وسط المخلفات بمقدار 20 غ من السكروز؛ ما شجّع على زيادة تنامي الفطر (Akharaiyi and Abiola, 2016, 58)، أما فيما يتعلق بنتائج أمثلة تركيب وقوام وسط المخلفات الزراعية فقد أظهر الوسط W1 تفوقاً نسبياً في التنمية على باقي الأوساط عن طريق قياس نصف قطر المستعمرة وكثافة الأفطورة (الجدول 3)، ويمكن أن يعود ذلك لاستعمال الأنواع المدروسة لألياف الوسط كمصدر غني بالكربون (De Vries and Visser, 2001, 500)، كما بينت النتائج عدم جدوى الوسط W3 المؤمثل في في زيادة تنمية الأنواع المدروسة، كما أظهرت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية الثلاث باستعمال الأوساط المتنوعة بدالة إحصائية أقل من 0.05، وكانت قيمة أقل فرق معنوي بين قيم المتوسطات LSD = 1.47.

الجدول 3. قطر مستعمرات الأنواع المنماة على وسطي خلاصة الشعير الصلب والمخلفات الزراعية.

نوع الفطر	الوسط المختبر، سم			
	MEA	W1	W2	W3
A. niger	0.5 ± 7	0.1 ± 5.3	0.1 ± 5	0.4 ± 2.1
A. flavus	0.4 ± 6.2	0.1 ± 5.0	0.3 ± 4.7	0.1 ± 3.6
A. avenaceus	0.2 ± 5.5	0.1 ± 4.1	0.1 ± 3.8	0.3 ± 3.3
0.042 = Sig 1.47 = LSD				

4.4 أمثلة pH في وسط المخلفات الزراعية

أظهرت نتائج أمثلة الرقم الهيدروجيني pH في وسط المخلفات الزراعية تفضيل الأنواع لأرقام متدرجة، حيث فضل النوع A. flavus الدرجة 5 و5.6 (الجدول 4)، ويتفق هذا مع نتائج بحث آخر (Kosegarten et al., 2017, 7) إذ أشار إلى تفضيل A. flavus عموماً لمجال 3.5 – 6.5 pH، وفي دراسة أخرى كان pH الأمثل لإنتاج الكتلة الحيوية للفطر نفسه 5.5 (El-Shora et al., 2015, 124)، وفضل النوع A. niger النامي على وسط المخلفات الزراعية pH 3 وخالفت نتائج هذا البحث نتائج دراسة

أخرى تبين فيها أن pH كان 6.5 (Dinarvand et al., 2017, 471) وفضل النوع A. avenaceus الرقم الهيدروجيني 5.6 على وسط المخلفات الزراعية؛ ما يسمح باستنتاج أن تغير pH للنوع الواحد بتغير وسط التنمية المستعمل إذ يفضّل A. flavus قيماً متقاربة نسبياً على أوساط تنمية مختلفة، إذ يفضّل pH لوسط وجبة أعلاف الدواجن آغار 6.5 ولوسط شابك دوكس آغار 6.5 ولوسط دكستروز البطاطا آغار 6 (Ahmed et al., 2016, 221)، كما أظهرت نتائج الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية الثلاث باستعمال أرقام هيدروجينية مختلفة بدالة إحصائية أقل من 0.05، وكانت قيمة أقل فرق معنوي بين قيم المتوسطات LSD = 0.366.

الجدول 4. قطر مستعمرات الأنواع المنماة على وسط المخلفات الزراعية ضمن pH مختلفة، سم.

A. avenaceus	A. flavus	A. niger	pH
0.1 ± 1.8	0.2 ± 3.7	0.3±6.9	3
0.1 ± 2.9	0.3 ± 3.9	0.1 ± 6.2	3.5
0.1 ± 3.7	0.3 ± 4.0	0.2 ± 6.1	4
0.1 ± 3.4	0.4 ± 4.2	0.1 ± 5.6	4.5
0.1 ± 3.5	0.2 ± 4.6	0.1 ± 5.7	5
0.1 ± 6	0.1 ± 4.5	0.1 ± 5.7	5.6
0.000 = Sig 0.366 = LSD			

5.4 أمثلة درجة الحرارة لوسط المخلفات الزراعية

أظهرت نتائج أمثلة الحرارة تفضيل الأنواع لدرجة الحرارة 28 م° (الجدول 5)، وخالفت نتائج هذا البحث نتائج بحث آخر كانت درجة النمو الفضلى للنوع A. flavus على وسط دكستروز البطاطا بين 30 – 32 م° (Kosegarten et al., 2017, 6)، وفي دراسة أخرى كان إنتاج A. flavus للتاناز في درجة حرارة مثلى 30 م° (El-Shora et al., 2015, 124)، وفي دراسة ثالثة على أمثلة شروط نمو A. niger على وسط مستخلص الخميرة بلغت درجة الحرارة الفضلى 30 م° (Dinarvand et al., 2017, 432) ويمكن أن يعود اختلاف تفضيل درجة الحرارة لاختلاف تركيب وسط التنمية المستعمل، كما أظهرت نتائج الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات أقطار مستعمرات الأنواع الفطرية الثلاث باستعمال درجات حرارة مختلفة بدالة إحصائية أقل من 0.05، وكانت قيمة أقل فرق معنوي بين قيم المتوسطات LSD = 0.32.

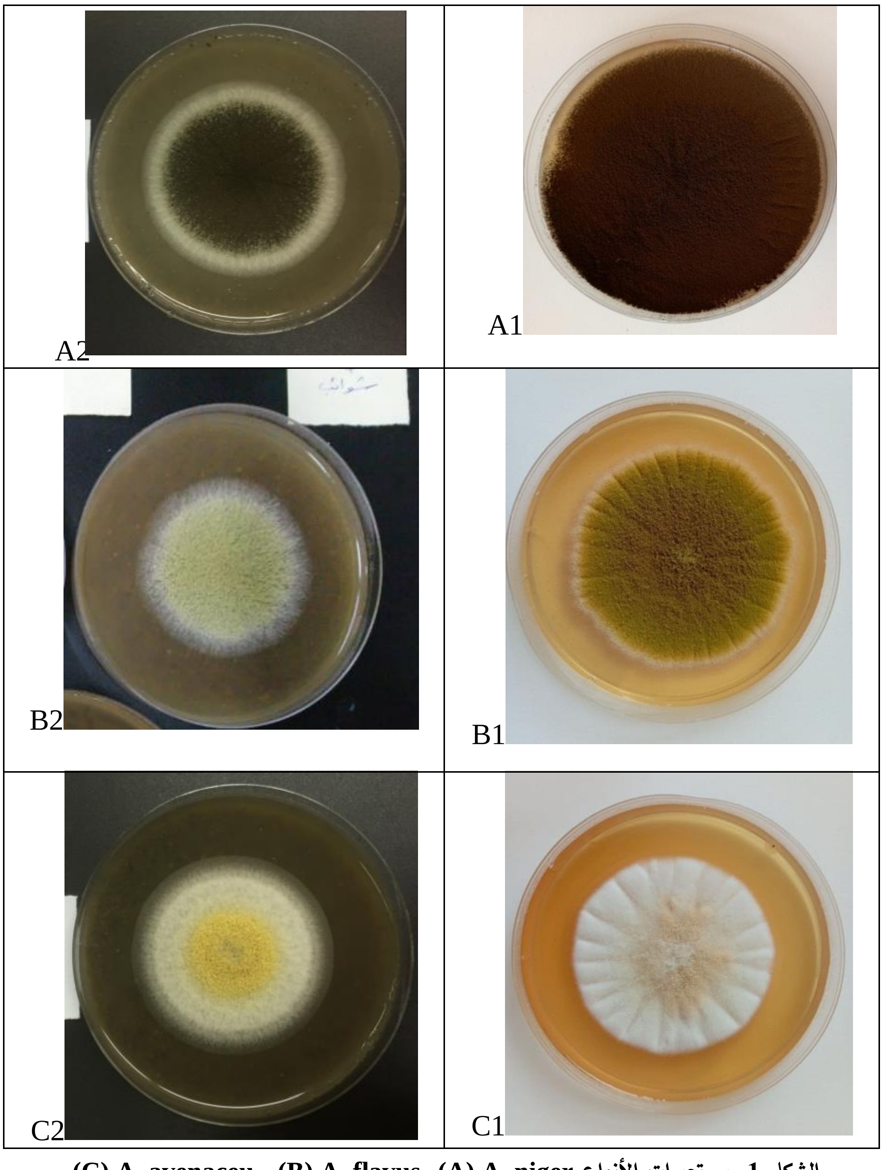
الجدول 5 . قطر مستعمرات أنواع Aspergillus المنماة على وسط المخلفات الزراعية ضمن درجات حرارة حضن مختلفة.

A. avenaceus	A. flavus	A. niger	درجة الحرارة م°
0.1 ± 3.5	0.1 ± 3.0	0.1 ± 4.5	20
0.1 ± 4.6	0.3 ± 4.5	0.1 ± 5.7	25
0.1 ± 6	0.3 ± 6.3	0.1 ± 7.5	28
0.2 ± 5.4	0.2 ± 5.4	0.1 ± 7.8	30
0.1 ± 1.8	0.2 ± 5.5	0.1 ± 8	37
0.000 = Sig 0.32 = LSD			

6.4. تقييم التغيرات المورفولوجية لمستعمرات الفطريات المنماة على وسط المخلفات الزراعية بعد أمثلته

أظهرت النتائج تبدل مورفولوجية مستعمرات الأنواع بتبدل نوع الوسط المستعمل إذ تميزت مستعمرة النوع A. flavus المنماة على وسط خلاصة الشعير الصلب بأنها ذات أفطورة ناعمة الملمس كثيفة ومنتظمة التمعّجات وصغيرة التحدّب وبمركز ذي لون أخضر زيتوني وحواف بيضاء تامة مستديرة وذات كثافة بوغية متوسطة B1 ، وقد أظهر الفطر تغيراً ظاهرياً كبيراً على وسط المخلفات

الزراعية، إذ اختفت التمعّجات المستعمرة وظهرت الأفطورة ناعمة متناثرة وبلون أخضر فاتح متجانس على كاملها وذات كثافة بوغية متوسطة أعلى بقليل من سابقتها B2 (الشكل 1)، أما فيما يخص النوع A. niger فتميزت المستعمرة المنماة على وسط خلاصة الشعير الصلب بأفطورة ناعمة الملمس خفيفة منتظمة التمعّجات غير محدبة وبلون بني غامق وحواف تامة مستديرة وذات كثافة بوغية عالية A1، وكانت المستعمرة المنماة على وسط المخلفات الزراعية بأفطورة ناعمة الملمس متماسكة منتظمة التمعّجات غير محدبة وبلون بني باهت وحواف بيضاء تامة مستديرة وذات كثافة بوغية منخفضة A2 (الشكل 1)، أما الصفات المورفولوجية للنوع A. avenaceus فتميزت المستعمرة المنماة على وسط خلاصة الشعير الصلب بأفطورة كثيفة الملمس ثخينة منتظمة الانثناءات قليلة التحدب وبلون أبيض ومركز أصفر باهت وبحواف تامة مستديرة وذات كثافة بوغية منخفضة جداً C1، وتبدلت الصفات على وسط المخلفات الزراعية إذ تميزت المستعمرة بأفطورة ناعمة الملمس خفيفة منتظمة التمعّجات محدبة وبلون أبيض ومركز أصفر فاقع وبحواف ناعمة وتامة مستديرة وذات كثافة بوغية متوسطة C2 (الشكل 1).



الشكل 1. مستعمرات الأنواع A. niger (A)، A. flavus (B) ، A. avenaceu (C)
على وسط المخلفات الزراعية 1 ووسط خلاصة الشعير الصلب2.

7.4 تحديد نسبة بروتين الفطريات المنمّاة على وسط المخلفات الزراعية بعد أمثلته

بينت النتائج تفوق وسط المخلفات الزراعية السائل المؤمثل على الوسط التجاري في تنمية الأنواع الفطرية وتشجيعه إنتاج كتلة حيوية أكبر وبالتالي الحصول على تركيز بروتين كلي أعلى ضمن أفطورة الأنواع وذلك على الرغم من احتواء الوسط التجاري على كمية أكبر من السكريات والبروتين الموجودة في الحجم نفسه من وسط المخلفات الزراعية المؤمثل (الجدول 1)، وتبين وجود تفوق نسبي لنتائج وزن الأفطورة للنوع A. avenaceus على باقي الأنواع، وبقي تركيز البروتين ثابتاً نسبياً، إذ أعطى النوع A. flavus على وسط خلاصة الشعير مردوداً وزنياً مقداره 0.365 ± 0.05 غ وتركيزاً للبروتين 19.88 ± 1 ملغ / غ، وأعطى على وسط المخلفات الزراعية المؤمثل مردوداً وزنياً مقداره 0.521 ± 0.06 غ وتركيزاً للبروتين 18.85 ± 0.5 ملغ / غ (الجدول 6)، بينما أعطى النوع A. niger على وسط خلاصة الشعير مردوداً وزنياً مقداره 0.18 ± 0.02 غ وتركيزاً للبروتين 20.83 ± 0.9 ملغ / غ، وأعطى على وسط المخلفات الزراعية المؤمثل مردوداً وزنياً مقداره 0.50 ± 0.08 غ وتركيزاً للبروتين 20.40 ± 0.7 ملغ / غ (الجدول 6)، وأعطى النوع A. avenaceus على وسط خلاصة الشعير مردوداً وزنياً مقداره 0.82 ± 0.04 غ وتركيزاً للبروتين 16.74 ± 0.40 ملغ / غ، وأعطى على وسط المخلفات الزراعية المؤمثل مردوداً وزنياً مقداره 1.14 ± 0.09 غ وتركيزاً للبروتين 21.82 ± 0.8 ملغ / غ (الجدول 6).

الجدول 6. وزن الأفطورة وتركيز البروتين للأنواع المدروسة على وسطي MEB وOAW.

الوسط		A. niger	A. flavus	A. avenaceus
وسط خلاصة الشعير	وزن الأفطورة (غ)	0.02 ± 0.18	0.05 ± 0.36	0.04 ± 0.82
	تركيز البروتين ملغ/غ	0.9 ± 20.83	1 ± 19.88	0.8 ± 16.74
وسط المخلفات الزراعية	وزن الأفطورة (غ)	0.08 ± 0.50	0.07 ± 0.52	0.09 ± 1.14
	تركيز البروتين ملغ/غ	0.7 ± 20.40	0.8 ± 18.85	0.8 ± 21.82
وزن الأفطورة في الوسطين		0.02 = Sig 0.092 = LSD		
تركيز البروتين في الوسطين		0.00 = Sig 2.11 = LSD		

ويمكن أن تعود نتيجة تفوق وسط المخلفات الزراعية في إنتاج الكتلة الحيوية والبروتين لاحتواء الوسط على عناصر طبيعية مثل الأملاح المعدنية والفينولات التي شجعت نمو الفطر وارتفاع نسبة الكربون إلى النتروجين إذ كانت 32:1 عن نسبتها في وسط خلاصة الشعير 5:1، إضافة إلى أمثلة الرقم الهيدروجيني لوسط المخلفات بما يتناسب مع الفطر، ويمكن تفسير تفوق الوسط السائل للمخلفات الزراعية على الوسط الصلب لكون الوسط السائل يسمح لإنزيمات الفطر بالحركة والتفاعل مع الوسط المغذي وتفكيكه وسهولة استعماله، كما بينت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين وزن الأفطورة وتراكيز البروتين للأنواع الفطرية المدروسة على الوسطين المستعملين بدالة إحصائية أقل من 0.05.

الاستنتاجات

1. احتواء وسط المخلفات الزراعية على كميات جيدة من السكريات والبروتين والألياف، وإمكان استعمال الوسط في تنمية أنواع فطر Aspergillus.
2. بلغت نسبة عنصري النتروجين والكربون في وسط المخلفات الزراعية 32:1.
3. تفضيل الأنواع A. flavus وA. avenaceus المنماة على وسط المخلفات الزراعية للرقم الهيدروجيني 5.6، وتفضيل النوع A. niger للرقم الهيدروجيني 3.
4. تفضيل الأنواع الفطرية المنماة على وسط المخلفات لدرجة الحرارة 28 م°.
5. اكتساب الأنواع الفطرية صفات مورفولوجية مميزة على وسط المخلفات الزراعية.

6. تفوق وسط المخلفات الزراعية السائل على وسط خلاصة الشعير السائل في التنمية وتحفيز إنتاج كتلة حيوية فطرية وتركيز بروتيني عال.

7. تفوق نوع A. avenaceus على باقي الأنواع في إنتاج كتلة حيوية فطرية.

التوصيات:

1. ضرورة تطوير وسط المخلفات الزراعية وضبط مكوناته للحصول على وسط طبيعي منافس للأوساط التجارية.
2. دراسة مقدرة أجناس أخرى من الفطريات في النمو على أوساط المخلفات الزراعية.
3. التحليل النوعي للبروتينات المنتجة، مثل الوزن النوعي وتنوع الحموض الأمينية وغيرها.

المراجع

1. البحرة، مروان، داغستاني، منال (2003). **التركيب الكيميائي للفول وقشر الفول**. مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، 2003. المجلد 19 (العدد الأول). 43-61. الجمهورية العربية السورية.
2. Abubakar, A., Suberu, H. A., Bello, I. M., Abdulkadir, R., Daudu, O. A., Lateef, A. (2013). **Effect of pH on mycelial growth and sporulation of Aspergillus parasiticus**. Journal of Plant Sciences 1(4): 64-67. Nigeria.
3. Ahmed, M. M., Fakruddin, M., Hossain, M. N., Mahbub, K. R., Chowdhury, A. (2016). **Growth response of Aspergillus flavus IMS1103 isolated from poultry feed**. Asian Journal of Medical and Biological Research, 2(2), 221-228. Dhaka, Bangladesh.
4. Ajdari, Z., Ebrahimpour, A., Abdul Manan, M., Hamid, M., Mohamad, R., Ariff, A. B. (2011). **Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of Monascus purpureus on solid state cultivation**. Journal of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2011, 9 pages. Malaysia.
5. Akharaiyi, F., Abiola, M. (2016). **Isolation and cultivation of fungi with agrowastes formulated media**. Der Pharm Chem, 8(9), 56-62. Nigeria.
6. Barthet, V. J., Daun, J. K. (2011). Seed morphology, composition, and quality Canola (pp. 119-162): Elsevier.
7. Basu, S., Bose, C., Ojha, N., Das, N., Das, J., Pal, M., & Khurana, S. (2015). **Evolution of bacterial and fungal growth media**. Bioinformation, 11(4), 182. India.
8. Bradford, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254. georgia.
9. Cereti, C. F., Rossini, F., Federici, F., Quaratino, D., Vassilev, N., Fenice, M. (2004). **Reuse of microbially treated olive mill wastewater as fertiliser for wheat (Triticum durum Desf.)**. Bioresource technology, 91(2), 135-140. Italy.
10. Chiou, P. W., Chiu, S., Chen, C. (2001). **Value of Aspergillus niger fermentation product as a dietary ingredient for broiler chickens**. Animal feed science and technology, 91(3-4), 171-182. taiwan.
11. Christabel, O., Dorcas, E., Elizabeth, U.(2016) **Suitability of food crop wastes in the formulation of laboratory media used for the cultivation of soil fungi**. International Journal of Food Science and Microbiology.Vol. 4 (3), pp. 137-141.Nigeria.
12. Chuppa-Tostain, G., Hoarau, J., Watson, M., Adelard, L., Sing, A. S. C., Caro, Y., Girbal-Neuhauser, E. (2018). **Production of Aspergillus niger biomass on sugarcane distillery wastewater: physiological aspects and potential for biodiesel production**. Fungal biology and biotechnology, 5(1), 1.France.
13. de Vries, R. P., Visser, J. (2001). **Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides**. Microbiology and molecular biology reviews, 65(4), 497-522. The Netherlands.
14. Diba, K., Kordbacheh, P., Mirhendi, S., Rezaie, S., Mahmoudi, M. (2007). **Identification of Aspergillus species using morphological characteristics**. Pakistan journal of medical sciences, 23(6), 867. Iran.
15. Dinarvand, M., Rezaee, M., Foroughi, M. (2017). **Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from Aspergillus niger ATCC 20611 by response surface methodology (RSM)**. Brazilian Journal of Microbiology, 48, 427-441. Brazil.
16. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. t., Smith, F. (1956). **Colorimetric method for determination of sugars and related substances**. Analytical chemistry, 28(3), 350-356. United States.
17. El-Shora, H. M., Awadalla, O. A., Metwally, S. M. (2015). **Optimization of tannase production by Aspergillus flavus**. Egypt J. of Expt. Bio, 11(2), 121-127. Egypt.
18. Fernandes, R. B. A., Carvalho Junior, I. A. d., Ribeiro Junior, E. S., Mendonça, E. d. S. (2015). **Comparison of different methods for the determination of total organic carbon and humic substances in Brazilian soils**. Revista Ceres, 62(5), 496-501. Brazil.
19. Garcıa, I. G., Pena, P. J., Venceslada, J. B., Martın, A. M., Santos, M. M., Gomez, E. R. (2000). **Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using Phanerochaete chrysosporium, Aspergillus niger, Aspergillus terreus and Geotrichum candidum**. Process Biochemistry, 35(8), 751-758. Spain.

20. Hamdy, H. S. (2013). **Production of mini-food by Aspergillus niger, Rhizopus oryzae and Saccharomyces cerevisiae using orange peels**. Romanian Biotechnological Letters, 18(1), 7929-7946. Egypt.
21. Huang, H., Singh, V., Qureshi, N. (2015). **Butanol production from food waste: a novel process for producing sustainable energy and reducing environmental pollution**. Biotechnology for biofuels, 8(1), 1-12. United States.
22. Kosegarten, C. E., Ramírez-Corona, N., Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A. (2017). **Description of Aspergillus flavus growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detection models**. International Journal of Food Microbiology, 240, 115-123. Mexico.
23. Krishnaswamy, A., Barnes, N., Lotlikar, N. P., Damare, S. R. (2019). **An improved method for protein extraction from minuscule quantities of fungal biomass**. Indian journal of microbiology, 59(1), 100-104. Hong Kong.
24. Lafi, A. S. A. (2010). **Produce the single cell protein (SCP) by the solid cultures methods from the different plant extracts wastes with Trichoderma viride and using in feed of Hamster Mesocricetus auratus**. Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences, 3(2). Iraq.
25. Pang, K.-L., Chiang, M. W.-L., Guo, S.-Y., Shih, C.-Y., Dahms, H. U., Hwang, J.-S., Cha, H.-J. (2020). **Growth study under combined effects of temperature, pH and salinity and transcriptome analysis revealed adaptations of Aspergillus terreus NTOU4989 to the extreme conditions at Kueishan Island Hydrothermal Vent Field, Taiwan**. PLoS One, 15(5), e0233621. Hong Kong.
26. Passos, L. P., Vidigal, M. C., de Sousa, F. B., Barud, H. S., de Paiva, A. F. C., Verneque, R. d. S., Freitas, V. d. P. (2006). **Autoclave-assisted acidic extraction of water-soluble carbohydrates in forage grasses**. Communications in soil science and plant analysis, 37(11-12), 1731-1746. Brazil.
27. Quamruzzaman, A., Khatun, A., Islam, F. (2020). **Nutritional Content and Health Benefits of Bangladeshi Eggplant Ccultivars**. European Journal of Agriculture and Food Sciences, 2(4). Bangladesh.
28. Sáez-Plaza, P., Michałowski, T., Navas, M. J., Asuero, A. G., Wybraniec, S. (2013). **An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish**. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 43(4), 178-223. England.
29. Saheed, O. K., Jamal, P., Karim, M. I. A., Alam, M. Z., Muyibi, S. A. (2016). **Utilization of fruit peels as carbon source for white rot fungi biomass production under submerged state bioconversion**. Journal of King Saud University-Science, 28(2), 143-151. Malaysia.
30. Said, S., Zaki, M., Asnawi, T., Novita, E. (2019). **Single cell protein production by a local Aspergillus niger in solid state fermentation using rice straw pulp as carbon source: effects of fermentation variables**. Paper presented at the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 543(1). 012002. Indonesia.
31. Sharma, G., Pandey, R. (2010). **Influence of culture media on growth, colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes**. Journal of yeast and fungal research, 1(8), 157-164. India.
32. Singh, A., Abidi, A., Agrawal, A., Darmwal, N. (2019). **Single cell protein production by Aspergillus niger and its evaluation**. Zentralblatt für mikrobiologie, 146(3), 181-184. India.
33. Smith, J. E. (2012). **Aspergillus.** Springer Science & Business Media. Volume 7. England.
34. Vadlapudi, V., Borah, N., Yellusani, K. R., Gade, S., Reddy, P., Rajamanikyam, M., Upadhyayula, S. M. (2017). **Aspergillus Secondary Metabolite Database, a resource to understand the Secondary metabolome of Aspergillus genus**. Scientific Reports, 7(1), 7325. British.
35. Yabaya, A., Ado, S. (2008). **Mycelial protein production by Aspergillus niger using banana peels**. Science World Journal, 3(4). Nigeria.